

Trabajo fin de grado 2015

# El cilio primario y el Sistema Nervioso Entérico



*Alumno:* Álvaro Guillorme Hernández

6º curso Grado Medicina 2009-2015

*Tutora:* Concepción Junquera Escribano.

Departamento de anatomía e histología humanas.  
Universidad de Zaragoza



Facultad de Medicina  
**Universidad Zaragoza**



<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
RESÚMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
I.-Inervación del tracto gastrointestinal.	8
1. Organización del SNE.	10
2. Funciones del SNE	11
3. La glía entérica.	12
3.1. Distribución, tipos y organización de las células gliales	12
3.2. Origen de las células gliales	12
3.3. Comunicación neuroglial	14
3.4. Funciones de la glía entérica.	14
3.5. La glía entérica como progenitor neuronal y glial.	15
4. Células intersticiales de Cajal.	16
II.- Cilio primario y Sistema Nervioso	18
1. Características específicas del cilio primario.	18
2. Funciones del cilio primario.	20
3. Presencia del cilio primario en células del Sistema Nervioso Central	23
III.- Objetivos del estudio.	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39



## RESÚMEN

El Sistema nervioso entérico (SNE) se compone de células gliales y neuronas con sus axones formando una red neural, distribuida principalmente en dos plexos ganglionados. Las células gliales presentan innumerables prolongaciones citoplásmicas que recubren las neuronas y sus axones. Estas células gliales entéricas son más parecidas en estructura y morfología a los atrociitos que otras células gliales del sistema nervioso periférico.

Algunas células gliales mantienen un potencial como células progenitoras incluso en adultos (zona subventricular de los ventrículos laterales y zona subgranular del giro dentado del hipocampo). Pese a que la neurogénesis se reconoce como una función fisiológica de algún tipo célula glial en el Sistema Nervioso Central (SNC), aún es tema de discusión la presencia de dichas propiedades en células gliales entéricas.

Dado que la presencia de cilio primario (CP) caracteriza a los progenitores neurales de la zona subventricular de ratones adultos, podría ser también una característica de los precursores gliales en el SNE.

En éste estudio se pretende documentar la existencia de CP en células gliales de colon humano. Para ello, se han tomado muestras de tejido intestinal sano procedentes de biopsia intraoperatoria al cual se le han aplicado los protocolos estándar para microscopio electrónico de transmisión (MET), y se han realizado cortes ultrafinos seriados.

Las células gliales que presentan CP tienen un núcleo voluminoso con eucromatina finamente granular. El CP es una estructura de 2-3  $\mu\text{m}$  de longitud cuyo axonema surge de un cuerpo basal; presenta un patrón 9+0 debido a la ausencia del par central de microtúbulos, que no se observa en los cortes seriados, así como tampoco se aprecian componentes relacionados con la motilidad, como los brazos de dineína o los filamentos radiales. Se han observado estructuras características: las fibras transicionales que unen el cuerpo basal a la membrana en la zona de transición, y satélites periféricos. Hasta 2/3 partes del cilio pueden localizarse en una invaginación de la membrana.

En la glía entérica existen células con características morfológicas diferentes, y probablemente funcionales. Proponemos que el cilio primario podría ser una característica de células precursoras gliales en SNE.

**PALABRAS CLAVE:** Cilio primario, sistema nervioso entérico, glia, neurogénesis.

**ABSTRACT:**

Enteric nervous system (ENS) is formed of glial cells, neurons and their axons, constituting a neural network, mainly distributed in two ganglionated plexuses. Glial cells are smaller than neurons and show creases and innumerable cytoplasmic processes that wrap neurons and their axons, as well as myelin, which does not appear in ENS. These glial cells in gut are more similar in structure and morphology to the astrocytes than to other glial-cell types of the peripheral nervous system.

Some glial cells maintain a progenitor potential even in adults (astrocytes in subventricular zone in the lateral ventricles and those in subgranular zone of dentate gyrus of hippocampus). Although neurogenesis is a well known physiological function of some adult glial cell types, the presence of these properties in enteric glial cells remains as a matter for discussion.

Since the existence of a primary cilium (PC) characterizes neural progenitor cells in the subventricular zone of the adult mouse, it could be also a feature of precursor glial cells in the ENS.

The purpose of this study is to present evidence of a primary cilium (PC) in glial cells from human colon. So, in samples corresponded with healthy intestinal tissue from surgical resection have been applied standard protocols for transmission electron microscopy (TEM) with ultrathin serial sections.

We have observed that glial cells can be located in direct contact with neuron membranes in the enteric ganglia but also extending their cytoplasmic prolongations around intraganglionic axons. The ganglion is surrounded by cytoplasmic prolongations of interstitial cells of Cajal.

We have found PC in intraganglionic cells which have large round nuclei with fine granular euchromatin. PC origin is a structure next to the nucleus and dictyosome and is 2 - 3  $\mu$ m length. Exhibits a 9+0 pattern because the central pair of microtubules is not observed in any of the serial sections, and it lacks motility-related components such as inner and outer dynein arms and radial spokes.

Each enteric glial population in gut wall presents a morphological, and presumably functional, different features. We propose that single cilia could be a characteristic of glial precursor cells in the ENS.

**KEY WORDS:** Primary cilium, enteric nervous system, glia, neurogenesis.

## **INTRODUCCIÓN**

### **I. Inervación del tracto gastrointestinal.**

El tubo digestivo recibe aferencias del sistema nervioso simpático y del parasimpático, cuya inervación predomina en todo el tracto gastrointestinal. El X par craneal ejerce función parasimpática, y se extiende hasta la mitad izquierda del intestino grueso, inervando en su trayecto al esófago, estómago y páncreas. La porción distal del tubo digestivo, compuesta por el colon descendiente, sigmoide, recto y ano, recibe inervación preferente del plexo parasimpático sacro que discurre junto a los nervios pélvicos. La acetilcolina, neurotransmisor de las sinapsis postganglionares de los nervios parasimpáticos, estimula la actividad secretora y de motilidad en el intestino.

La inervación simpática proviene de los pares vertebrales que van de T5 a L2 y se extiende por todo el aparato digestivo tras reunirse en los ganglios celíaco, mesentérico superior y mesentérico inferior, de los que surgirán los axones de las neuronas postganglionares. Las terminaciones postsinápticas simpáticas secretan noradrenalina y, en una cantidad muy inferior, adrenalina, que ejercerán un potente efecto inhibitor sobre las funciones gastrointestinales. La inervación sensitiva permite captar la irritación de la mucosa, la presencia de sustancias químicas agresivas o distensiones de la capa mucosa, y producirá un efecto inhibitorio o excitatorio en función del estímulo transmitido. (Figura 1).



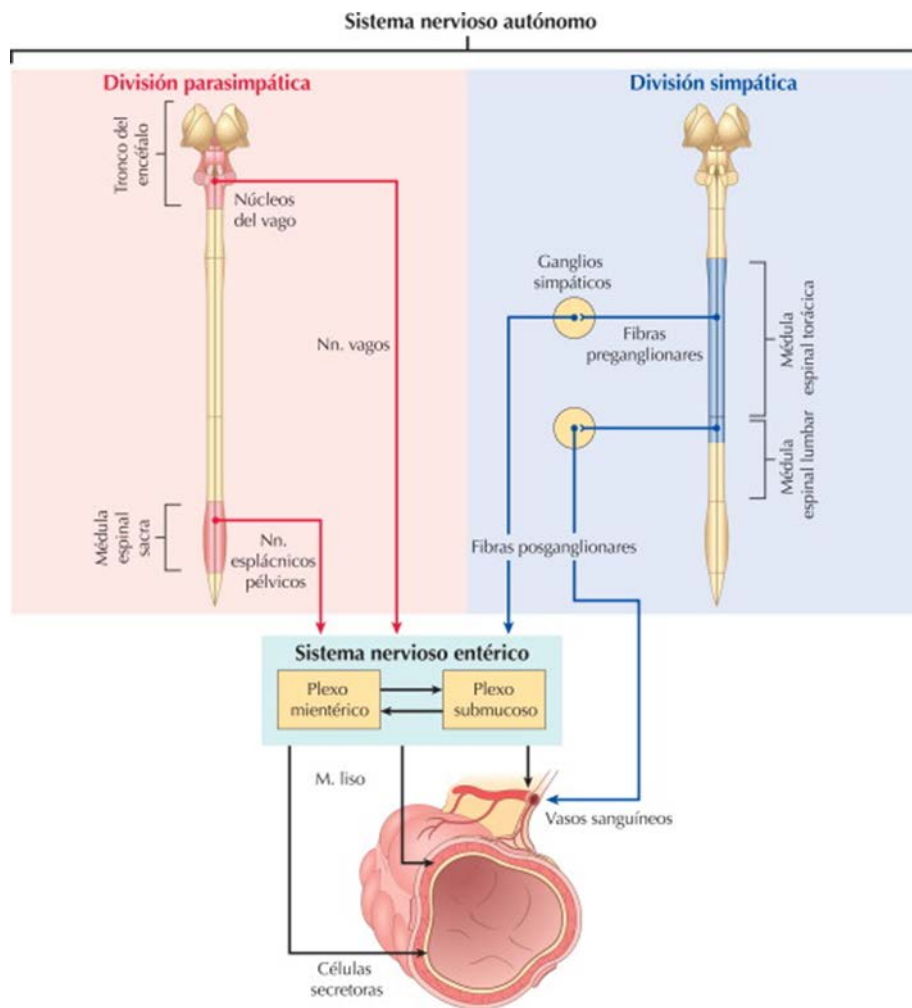


Figura 1. Organización del sistema nervioso entérico y su conexión con el sistema nervioso autónomo.

La tabla 1 resume la actividad simpática/parasimpática en el tracto gastrointestinal, en función del mediador que libera la neurona: acetilcolina (Ach) pre y postganglionar en el sistema parasimpático, y acetilcolina preganglionar/noradrenalina postganglionar en el sistema simpático.

<b>Estructura efectora</b>	<b>Simpático</b>	<b>Parasimpático</b>
Vasos sanguíneos	Contracción	Dilatación
Secreciones salivares	Aumentan	Disminuyen
Músculo liso gastrointestinal	Relaja	Contrae (aumento de la motilidad)
Esfínteres gastrointestinales	Contrae	Relaja
Secreciones gastrointestinales	-	Aumentan
Secreción de insulina	$\alpha_2$ : Inhibe $\beta_2$ : Aumenta	-

Tabla 1: Funciones del SNA según la actividad simpática/parasimpática de las neuronas que lo integran.

Además de esta inervación extrínseca el tubo digestivo posee un tercer nivel de control de la actividad gastrointestinal: el que rigen los propios plexos entéricos sin aferencias de sistema nervioso central y constituyen el denominado Sistema Nervioso Entérico (SNE).

### 1. Organización del SNE.

El Sistema nervioso entérico está formado por unos 500 millones de neuronas, es decir, la centésima parte del número de neuronas en el cerebro, y 5 veces las neuronas de la médula espinal. Deriva de células de la cresta neural y aparece formando parte del tracto gastrointestinal, extendiéndose desde el esófago hasta el ano. Se compone de células ganglionares y glía, así como células intersticiales de Cajal.

Las neuronas se agrupan en dos tipos de ganglios: plexo mientérico (Auerbach) y plexo submucoso (Meissner). El plexo mientérico se localiza entre las capas musculares interna y externa mientras el plexo submucoso aparece en la capa submucosa.

Además, existe la presencia de cuerpos neuronales entéricos presentes en la lámina propia de la mucosa: el plexo mucoso y el plexo subseroso en la capa de tejido conectivo, el plexo muscular profundo entre las fibras musculares, y el plexo mucoso circular (Furness, 2006). (Figura 2).

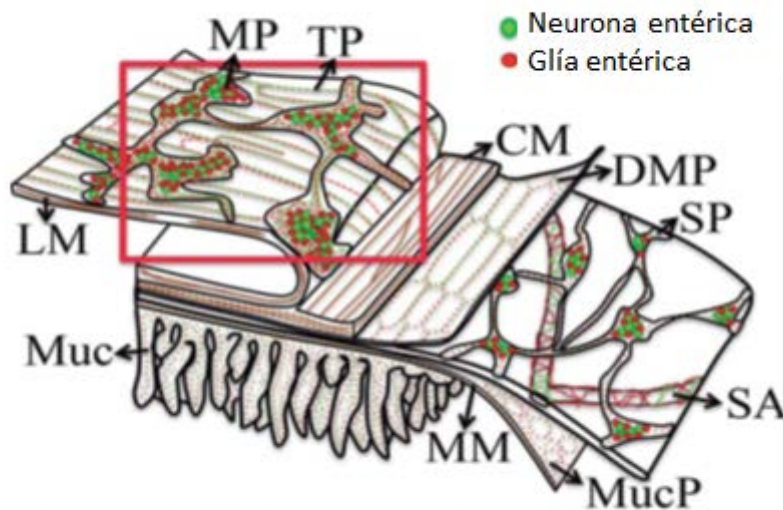


Figura 2. Estructura de la pared intestinal. Muc: mucosa; MM: muscularis mucosa; MucP: plexo mucoso; SA: Arteria submucosa; SP: plexo submucoso; LM: músculo longitudinal, DMP: plexo muscular profundo; CM: músculo circular; MP: plexo mientérico.

## 2. Funciones del SNE

El SNE es el encargado de regular los movimientos peristálticos de la musculatura lisa del tracto gastrointestinal, así como inervar vasos, células epiteliales y células endocrinas.

En el SNE existen diferentes estirpes neuronales asociadas a funciones específicas. Así pues, las neuronas sensoriales informan sobre las condiciones mecánicas y químicas. Las neuronas motoras controlan el peristaltismo que transporta el contenido intestinal, mientras que otras neuronas controlan la secreción de enzimas. Dado que incluye neuronas aferentes, interneuronas, y neuronas eferentes, puede actuar como centro integrador de señales y llevar a cabo actos reflejos complejos, como el vómito.

El SNE también regula otras funciones, entre las que destacan la respuesta inmune, absorción de nutrientes, regulación del flujo sanguíneo... por lo que alteraciones en éste sistema afectan a la homeostasis, lo que puede ocasionar patología intestinal/extraintestinal.

### **3. La glía entérica.**

#### **3.1. Distribución, tipos y organización de las células gliales.**

Las células gliales entéricas son más pequeñas que las neuronas y dos veces más abundantes. Presentan de forma característica innumerables gliofilamentos y prolongaciones citoplasmáticas de diferentes formas y tamaños. Se encuentran en contacto directo con las membranas neuronales, y pueden localizarse tanto en los ganglios como en las fibras nerviosas extraganglionares que contactan los ganglios entre sí, que son las neuronas. (Gabella, 1972).

Morfológicamente éstas células gliales son más similares a los astrocitos que a cualquier otra célula del sistema nervioso periférico, y presentan una morfología estrellada e irregular. Curiosamente la glía entérica expresa las mismas isoformas de la proteína ácida gliofibrilar (GFAP) que los astrocitos.

Como los astrocitos, presentan diferentes características morfológicas, y se distinguen 4 subclases distintas en función de su localización. La proporción de su distribución varía según el plexo, así como de la especie. Así tenemos:

- Tipo I: Glía protoplásmica, similar a astrocitos protoplásmicos.
- Tipo II: Glía fibrosa entérica, en tractos fibrosos, como los astrocitos.
- Tipo III: Glía mucosa, en el espacio subepitelial.
- Tipo IV: Glía entérica intramuscular.

#### **3.2. Origen de las células gliales**

Derivan de progenitores que surgen del nivel vagal de la cresta neural (CN), y migran en dirección rostrocaudal. La CN vagal (originaria de los somitas 1-7) es la principal fuente de células ganglionares entéricas, con excepción de una pequeña parte compuesta por células derivadas de la cresta sacra (figura 4).

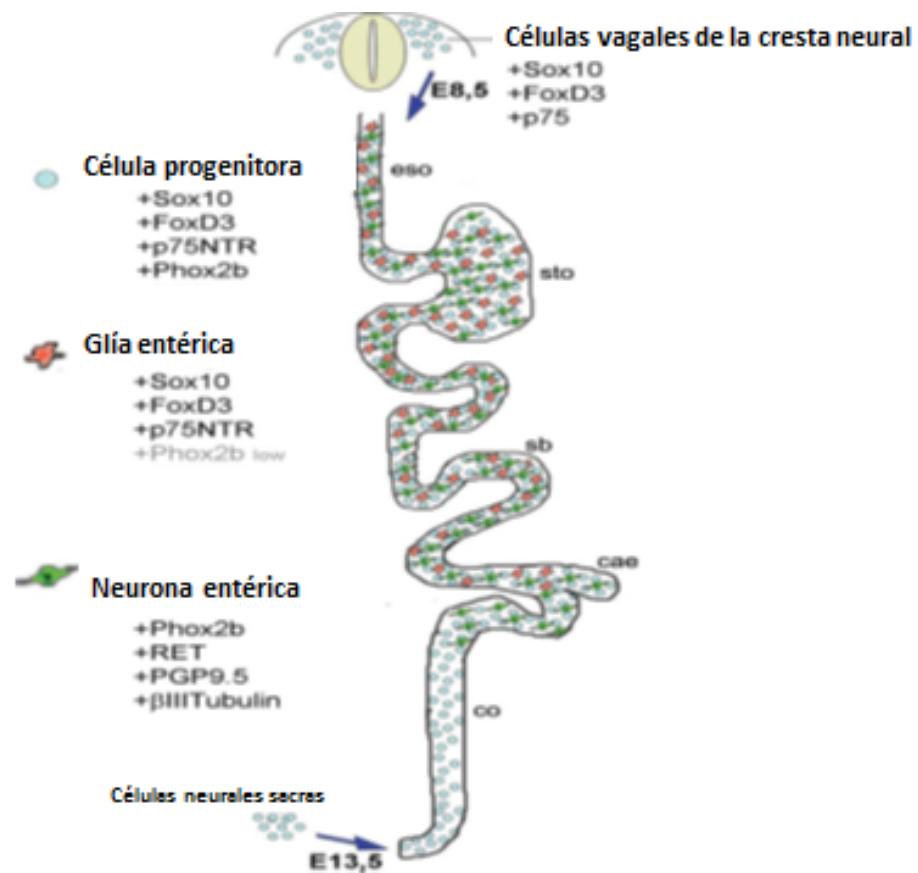


Figura 3. Colonización del tracto gastrointestinal de ratones por las células de la cresta neural y marcadores que expresan durante su migración.

El complejo proceso de la gliogénesis abarca una extensa variedad de interacciones entre la célula progenitora y el medio. Desde el mesénquima del tubo digestivo se producen distintos factores de crecimiento que promueven la diferenciación neuronal y glial, entre ellos el factor neurotrófico derivado glial (GDNF), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), y neurotrofina-3 (NT3). Estos factores tienen la misma función que en el SNC.

La vía de señalización Sonic hedgehog (Shh), cuyos receptores se localizan en el cilio primario, reprimen la inducción neuronal mediada por GDNF en las células de la cresta neural. A bajas concentraciones GDNF promueve la proliferación tanto de neuronas como de glía, mientras que a altas concentraciones promueve la proliferación neuronal.

Las señales Shh y Notch son esenciales para el desarrollo del SNE, a través del siguiente mecanismo: Shh regula el desarrollo de mesénquima intestinal mediante la restricción de la actividad de Notch, que es probablemente el mediador clave de este proceso de proliferación celular.

En el proceso de diferenciación se van silenciando unos genes y expresando otros de manera que al final un conjunto diferente de proteínas caracterizarán a las células gliales o a las neuronas, como queda reflejado en el esquema de la figura 3. Como

vemos los principales marcadores de las células gliales en este proceso son: Sox10, Fox D3 y p75.

### **3.3. Comunicación neuroglial**

Aunque la relación neurona-glia no está tan bien comprendida como en SNC, la idea de que la glía entérica modula la actividad neuronal se ha defendido en numerosos artículos. Este supuesto se basa en el hecho de que las células gliales interactúan con las neuronas en el interior del ganglio por su estrecha proximidad. Las células gliales entéricas tienen mecanismos similares a los astrocitos: producen precursores de neurotransmisores, expresan receptores de neurotransmisores, tienen mecanismos de captación y degradación de neurotransmisores, y mecanismos de liberación de moléculas señalizadoras tales como factores tróficos que mantienen las interacciones entre glía y neuronas.

La activación de la glía entérica por las neuronas provoca respuestas tales como el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y del AMP cíclico, entre otros procesos.

### **3.4. Funciones de la glía entérica.**

La glía constituye cuantitativamente el principal componente celular del sistema nervioso entérico, por lo que clásicamente se ha considerado tejido de sostén neuronal. Sin embargo las células gliales entéricas desempeñan diferentes funciones, muchas de las cuales están hoy en día en estudio.

Las funciones más importantes que se han descrito son:

1. Neuroprotección.

El citoplasma glial envuelve a la neurona, e intercambian señales bioquímicas. Su papel neuroprotector se comprende gracias a mediadores como el glutatión y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Además se ha sugerido que regulan la expresión de neuromediadores, ya que se han observado cambios fenotípicos neuronales tras alteraciones en células gliales.

2. Regulación de la barrera epitelial y sus funciones.

La glía entérica mucosa se sitúa muy cerca del borde epitelial (<1 mm) y los procesos terminales aparecen ocasionalmente en contacto directo con la membrana basal epitelial y capilares sanguíneos de la lámina propia. Así pues, la glía entérica controla la proliferación de células epiteliales así como la adhesión entre ellas, de forma similar a los astrocitos, que controlan la adhesión de células endoteliales de vasos sanguíneos que forman la barrera hematoencefálica (Savidge et al., 2007). La glía entérica secreta TGF  $\beta$ 1, lo cual

afecta negativamente a la proliferación celular, e incrementa la superficie apical de células epiteliales. (Neunlist et al., 2007).

Otras funciones de la glía, y las principales líneas de investigación son:

- Regulación de la homeostasis intestinal: por su implicación en patología digestiva/extradigestiva (íleo postoperatorio, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, párkinson...)
- Procesos inflamatorios: Dada su capacidad para secretar mediadores químicos e inmunológicos, en base a desarrollar nuevas dianas terapéuticas. (figura 4).

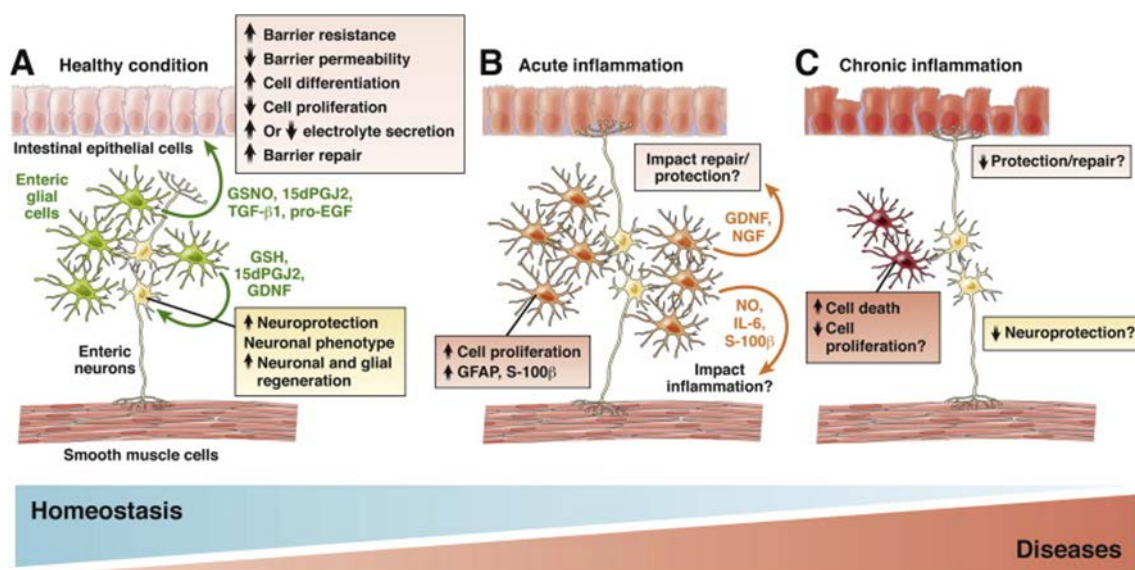


Figura 4. (A) Bajo condiciones fisiológicas, la glía entérica regula diferentes funciones a través de la liberación de mediadores específicos. Además, ejercen protección y reparación de la barrera. (B) En situaciones de estrés ambiental (mediadores inflamatorios, bacterias) se produce una gliosis reactiva (Similar a la astrogliosis cerebral), que podría intervenir en el desarrollo de inflamación intestinal, pero también en protección/reparación de lesiones inducidas por tales procesos inflamatorios. (C) La muerte de células gliales, por patógenos específicos, virus, ó gliosis alterada, contribuye a la degeneración neuronal de la barrera, que puede derivar en patología crónica intestinal/extraintestinal.

### 3.5. La glía entérica como progenitor neuronal y glial.

Algunos tipos de células gliales conservan potencial progenitor, y pueden reemplazar y reponer regiones dañadas con células nuevas, incluso en adultos. Por ejemplo, los astrocitos de la zona subventricular de los ventrículos laterales, o aquellos astrocitos

de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, el cual sustenta la neurogénesis en el cerebro adulto (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2008). Incluso en la corteza cerebral adulta los astrocitos se pueden diferenciar mediante conversión directa en neuronas funcionales cuando son inducidas por factores transcripcionales específicos.

Aún está en discusión si la glía entérica presenta dichas propiedades. Diferentes estudios *in vitro* en intestino adulto de humanos, han encontrado células con propiedades de células madre y características inmunocitoquímicas semejantes a los progenitores de la cresta neural. Además, se ha demostrado *in vitro* que agonistas 5-HT4 incrementan la proliferación y densidad neuronal. *In vivo*, una colitis inducida aumenta el número de neuronas mientéricas, lo cual se inhibe antagonizando 5-HT4.

Muy interesante es el hecho de que la señalización 5-HT4 incrementa la proliferación glial, pero no el número de células gliales, lo que permite hipotetizar que la glía tal vez aumente el número de neuronas.

El grupo de investigación en el que he realizado este trabajo tiene como hipótesis de partida que del mismo modo que existe reparación neuronal en el Sistema Nervioso Central, deberá de existir neurogénesis en otras localizaciones del Sistema Nervioso Periférico y de forma particular en el Sistema Nervioso Entérico, regulador del correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal humano.

Las células progenitoras encargadas de la reparación del Sistema Nervioso Entérico necesariamente deben encontrarse en la pared del tubo digestivo, donde podrán ser identificadas unívocamente. Al igual que en el Sistema Nervioso Central, ¿podría plantearse una naturaleza astrogial para estas células progenitoras? ¿presentaran, como aquellas, alguna característica ultraestructural que nos permita identificarlas? ¿cuál es el nicho natural de estas células? ¿qué relaciones establecen con las células de su entorno?

#### **4. Células intersticiales de Cajal.**

Santiago Ramón y Cajal descubrió una nueva estirpe celular asociada a los plexos entéricos y a células musculares lisas de la capa circular del intestino. Son las llamadas células intersticiales de Cajal (ICCs). En el plexo mientérico se localizan rodeando a los ganglios y cercanas a los troncos nerviosos. Por sus características fueron consideradas por el propio Cajal, como neuronas primitivas, lo que a día de hoy aún genera controversia.



- Morfología:

Mediante microscopía electrónica se han descrito éstas células, que varían ligeramente según su localización. En general presentan formas estrelladas, triangular, ó fusiforme y núcleos muy voluminosos con una franja estrecha de heterocromatina marginal. El núcleo aparece rodeado por un escaso citoplasma, que sin embargo, se expande en largas prolongaciones citoplasmáticas. Estas prolongaciones se adentran en el tejido conectivo que rodea a las células de músculo liso y contactan con ellas. También se acoplan con procesos de otras ICCs situadas en ambas capas musculares intestinales, formando una red tridimensional, siendo frecuentes los contactos intercelulares tipo gap. Suelen establecer relaciones dobles, contactando a la vez con axones y con células musculares lisas. Estas células presentan un cilio primario (estructura 9+0). (Junquera et al. 2007).

- Función:

Las células intestinales de Cajal, tras muchos años de controversia, son aceptadas como un “marcapasos” del intestino, con similitudes funcionales respecto a las células del nódulo sinusal. Hoy en día son objeto de investigación en patologías del tracto gastrointestinal.

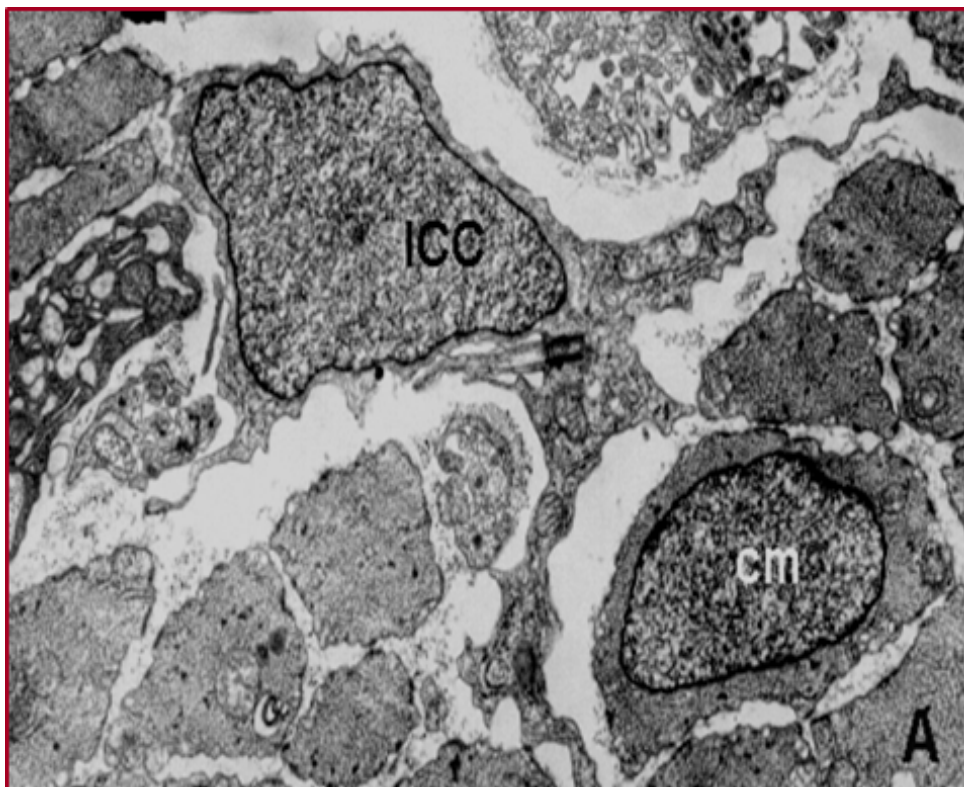


Figura 5. Cilio único en una ICC.

## II.- Cilio primario y Sistema Nervioso

### 1. Características específicas del cilio primario.

El cilio primario es una estructura solitaria de unos 2-3  $\mu\text{m}$  de tamaño sin movimiento activo, derivada del par de centriolos, a partir de uno de los cuales, situado en posición perpendicular respecto al otro, forma el cuerpo basal del cilio primario, que contiene proyecciones microtubulares que forman el axonema, y envuelta por la membrana celular. Se origina próximo al núcleo y en su proximidad aparecen dictiosomas del aparato de Golgi. (Figura 6).

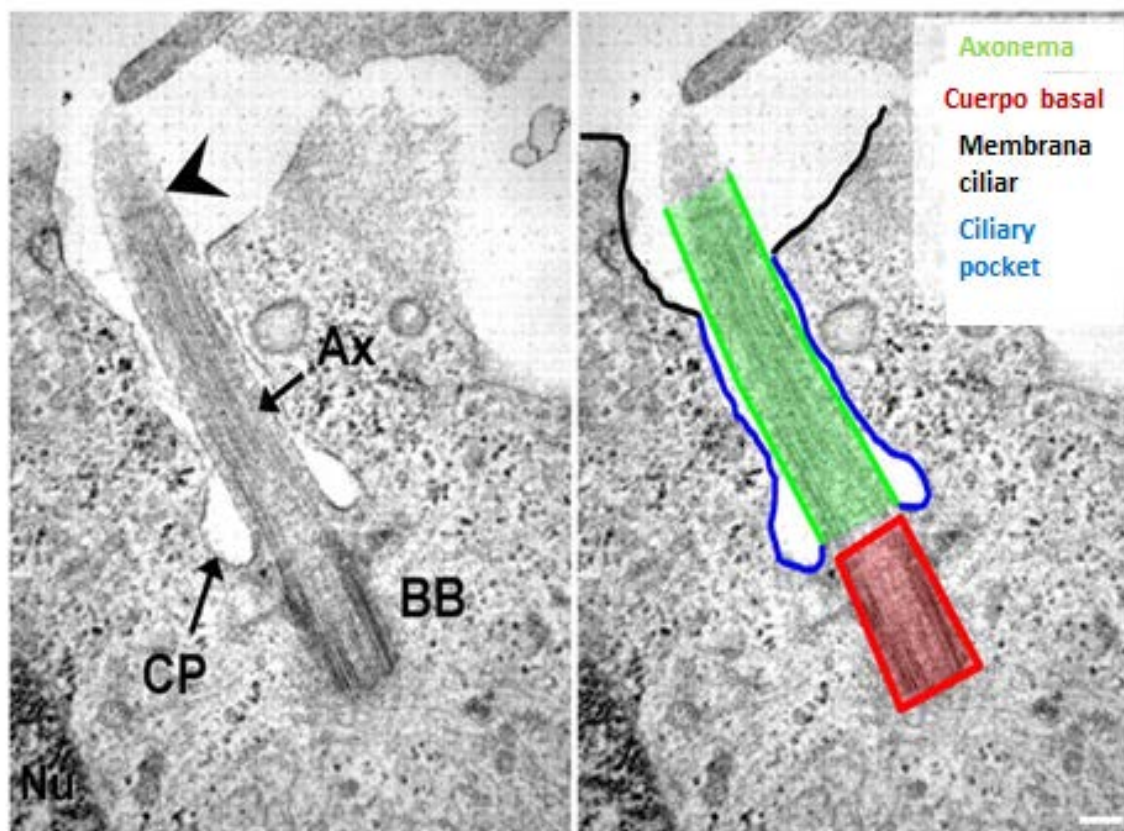


Figura 6. Esquema de las partes del cilio primario, formado por un cuerpo basal (BB) derivado de un centriolo, del que surge un axonema (Ax) que forma el tallo, y todo ello envuelto por membrana, que se pliega formando una vaina que deja un fondo de saco llamado bolsa ciliar (CP). En la parte inferior izquierda de la imagen se puede ver el núcleo (Nu).

Presenta una estructura interna diferente a la de los cilios motores, cuya conformación es conocida como una distribución de microtúbulos “9+2”, en la cual nueve pares de microtúbulos rodean a los dos que forman el par central. En el cilio primario los microtúbulos se disponen sin elemento central, así como tampoco fibras radiales ni brazos de dineína, conformando una distribución “9+0”. (Figura 7). (Satir P et al. 2010).

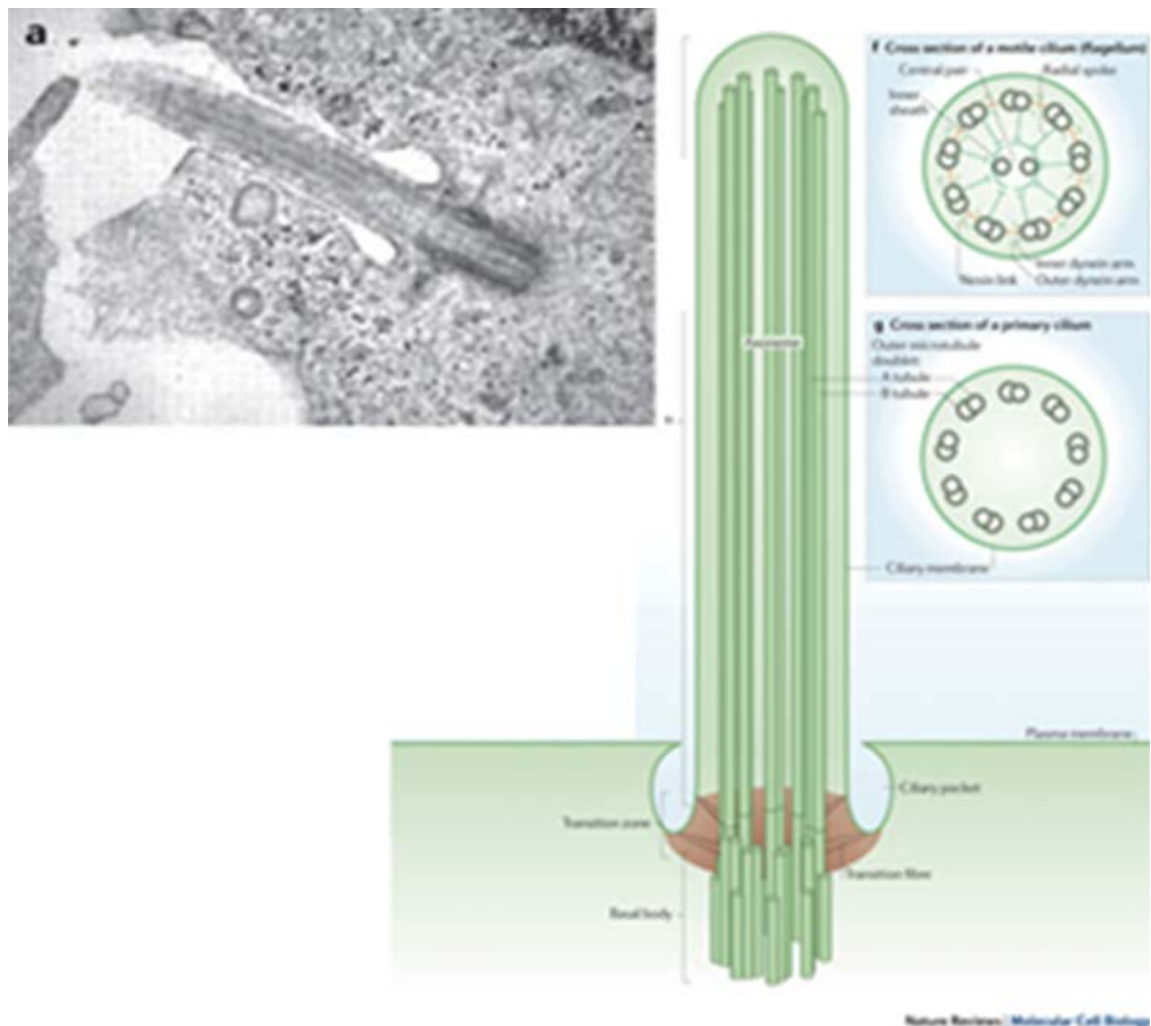


Figura 7. El cilio primario consta de un cuerpo basal derivado de un centriolo, cuyos microtúbulos se agrupan en dobletes (en contraste con los tripletes de microtúbulos que constituyen los centriolos). Existe una zona transicional entre el cuerpo basal y el axonema llamada zona transicional, cubierta por una vaina membranosa que forma un pliegue llamado *ciliary pocket*.

Además, muchos de estos cilios primarios no se proyectan más allá de la superficie celular, encontrándose inmersos en una vaina membranosa que se pliega formando

un saco ciliar, conocido como “ciliary pocket” que podríamos traducir como bolsa ciliar. (Figura 8).

En una sección transversal podemos observar con claridad las diferencias con el cilio móvil: Desaparece el par central de microtúbulos con su vaina, los brazos de dineína, los puentes de nexina, y los filamentos radiales.

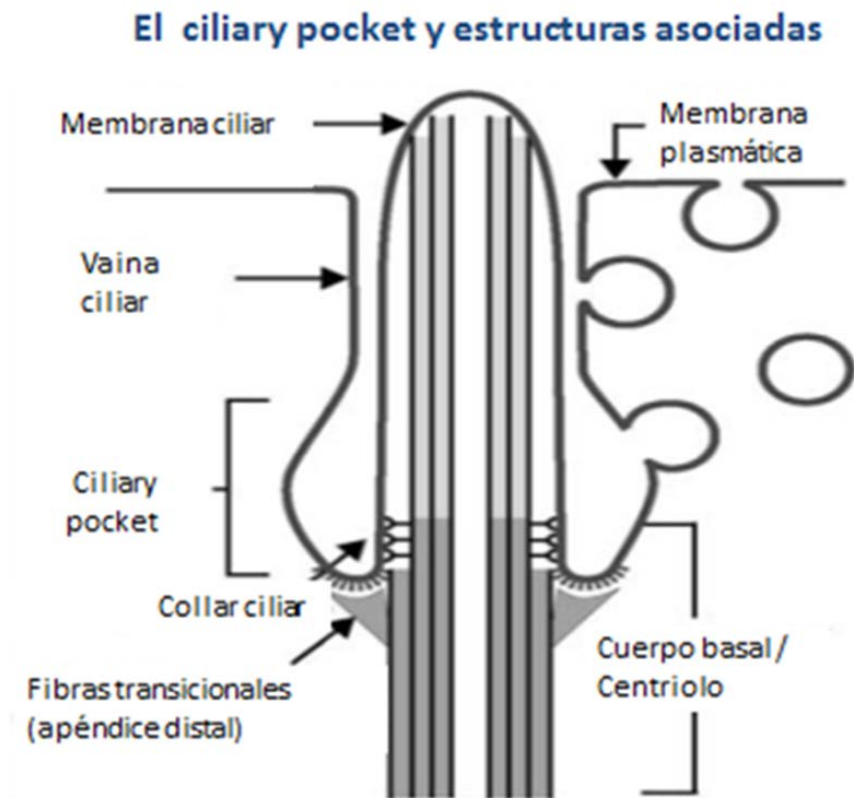


Figura 8. Esquema de un cilio primario en corte longitudinal.

La bolsa ciliar proviene de una vesícula del aparato de Golgi que se ancla en la parte superior del centriolo a modo de capuchón, que en contacto con la membrana externa se fusiona con ella quedando el cilio en contacto con el exterior, pero embebido en el bolso ciliar.

## 2. Funciones del cilio primario.

Cuando se descubrieron por primera vez, se pensaba que eran estructuras vestigiales, o tal vez servían para “aparcar” los centriolos cuando la célula no se estaba dividiendo. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la importancia de esta pequeña estructura.

Una de las primeras patologías asociadas al cilio primario fue la poliquistosis renal, en la cual las células que rodean a la nefrona, que constan de cilios primarios, falla el transporte de calcio y las nefronas sufren apoptosis. Conociendo que estos cilios no tienen un movimiento activo, pero sabiendo que su ausencia provoca esta patología, se realizó un análisis de las células del túbulo renal que puso de manifiesto que los cilios oscilan pasivamente a la dirección de un flujo de la orina en un riñón en funcionamiento, y que los cilios primarios actuaban como mecanorreceptores, abriendo canales  $\text{Ca}^{2+}$ . (Figura 9).

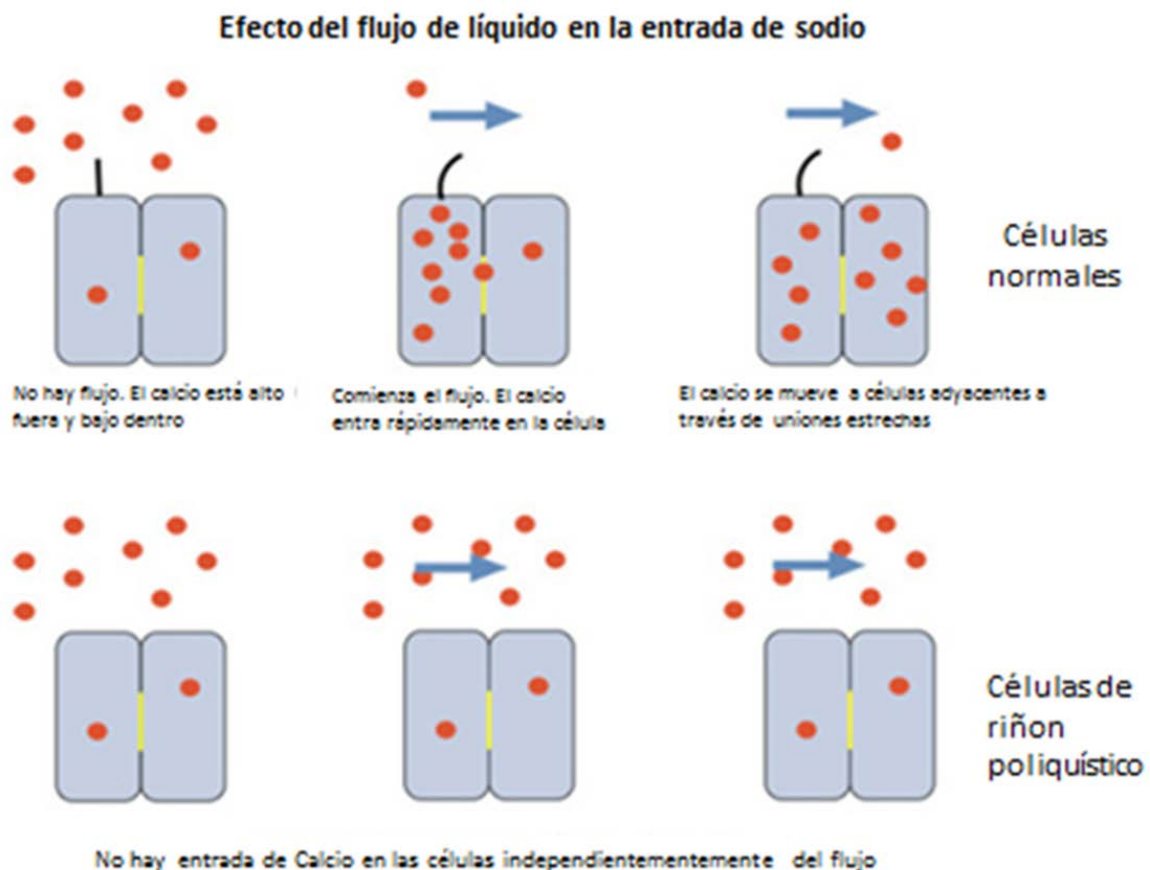


Figura 9: El efecto del flujo de fluido en la captación de calcio en las células normales del riñón y en poliquistosis renal. Los cilios primarios en las células normales responden a la señal mecánica producida por el líquido que fluye para iniciar una rápida absorción de calcio. En la poliquistosis renal carecen de cilios primarios, y no muestran respuesta al flujo.

Una vez observado que pueden funcionar como mecanorreceptores, se ha demostrado que también pueden actuar como otros tipos de receptor: quimiorreceptor, fotorreceptor, termorreceptor, osmorreceptor, e incluso receptor gravitacional. En la figura 11 se muestran dos ejemplos: como mecanorreceptores y como fotorreceptores, ambas funciones requieren sistemas de transporte activo a lo largo de los microtúbulos, más conocido como transporte intraflagelar. (Pedersen L.B., Rosenbaun J.L., 2008).



El buen funcionamiento del cilio primario está condicionado por un correcto transporte intraflagelar (IFT). Este transporte se realiza con la ayuda de proteínas motoras (dineínas y quinesinas) que transportan diferentes tipos de moléculas a lo largo de los microtúbulos del axonema. Las moléculas que se incorporan al axonema ciliar llegan hasta él desde los dictiosomas del Aparato de Golgi transportadas en vesículas.

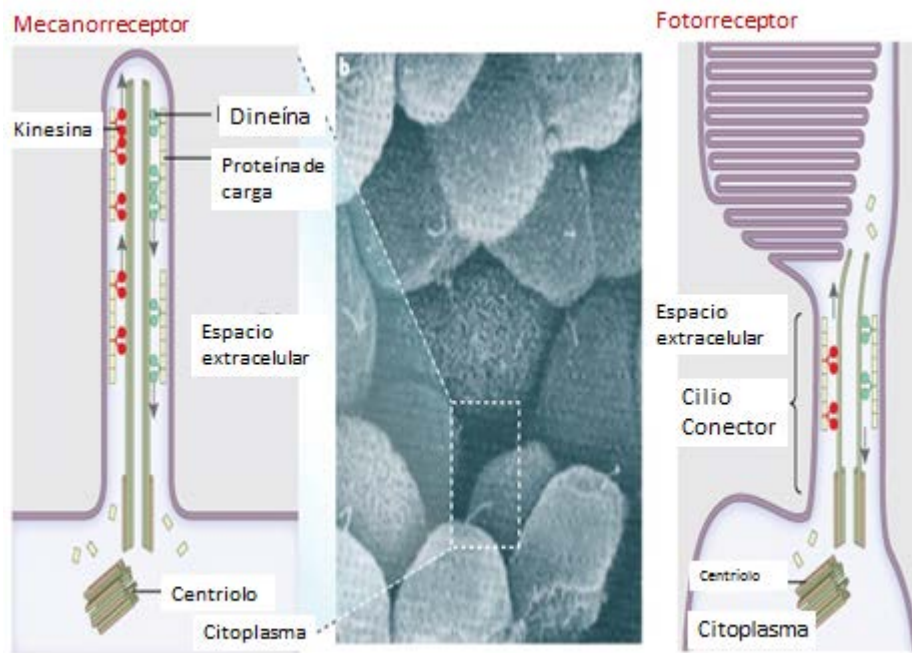


Figura 10: Dos receptores sensoriales celulares diferente proporcionados por su cilio primario.

Sabiendo que los cilios primarios pueden ejercer tal variedad de funciones como receptor, no resulta demasiado arriesgado pensar que tal vez fuesen a su vez capaces de actuar como “antenas” celulares que no solo captan señales del medio extracelular sino que además son capaces de transducir estas señales hacia el interior celular.

Efectivamente la membrana ciliar es una estructura especializada que alberga, dependiendo del tipo celular, diferentes receptores específicos capaces de enviar al interior celular señales que conducen a la célula a proliferar, diferenciarse o desplazarse, según el tipo de señal recibida. En la figura 11 se resumen las principales vías de señalización relacionadas con el cilio primario, ya que los receptores se localizan específicamente en la membrana ciliar. Si nos fijamos en la respuesta celular que producen estas señales (proliferación, diferenciación, remodelación tisular...) comprenderemos por qué el cilio primario juega un papel fundamental en la homeostasis celular, en el desarrollo, y en la renovación tisular. (Irigoien F., Badano J.L. 2011).

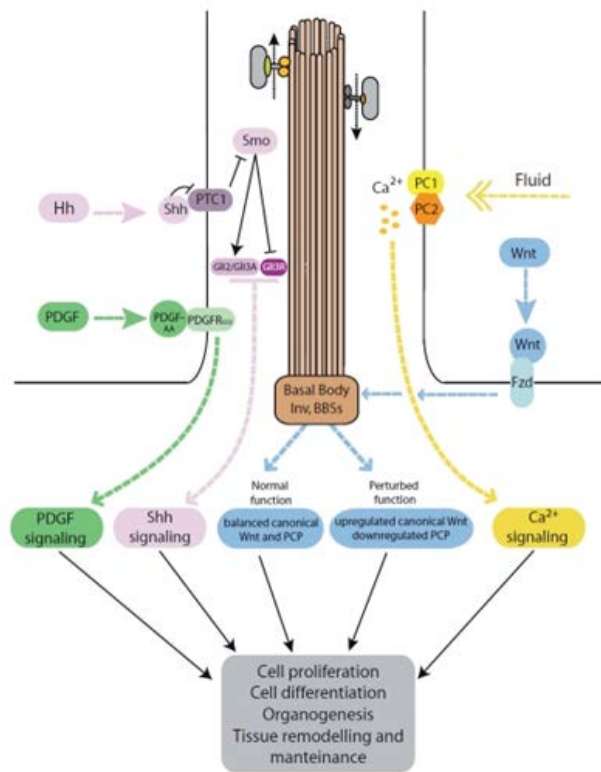


Figura 11. Principales vías de señalización en las que interviene el cilio primario.

### 3. Presencia del cilio primario en células progenitoras del Sistema Nervioso Central

Mientras que en el cerebro los cilios móviles se encuentran únicamente en células endoteliales delimitando el ventrículo y en algunas células de plexos coroideos, el cilio primario está presente virtualmente en todas las células cerebrales, incluyendo progenitores, neuronas, y astrocitos. (Luesma M.J. et al. 2013).

El cilio coordina diferentes vías de señalización, que son críticas tanto en desarrollo embrionario como en la homeostasis del cerebro adulto. La integridad del cilio es esencial en la vía Shh en mamíferos. La vía Shh es esencial en el desarrollo de los vertebrados. Es responsable del establecimiento del patrón del tubo neural de tal modo que las neuronas motoras se originan a partir de la región ventral y las neuronas sensoriales se origina a partir de la región dorsal; pero además es clave en el mantenimiento de los progenitores neurales en aquellas regiones del cerebro adulto donde existe neurogénesis. De momento, se conoce que en ratones transgénicos en los que se ha eliminado el cilio primario aparecen defectos de neurogénesis en el hipocampo. (Han et al. 2008).

Dado que Shh participa en la expansión de progenitores postnatales en el Sistema Nervioso Central, surge una pregunta acerca de si la neurogénesis en el SNE adulto está controlada también por el cilio primario.

Como se resume en la figura 12, diversas investigaciones han relacionado también la vía de señalización Shh en el mantenimiento de precursores en los ganglios entéricos, en el patrón de migración, y en los procesos de gliogénesis y neurogénesis del SNE.

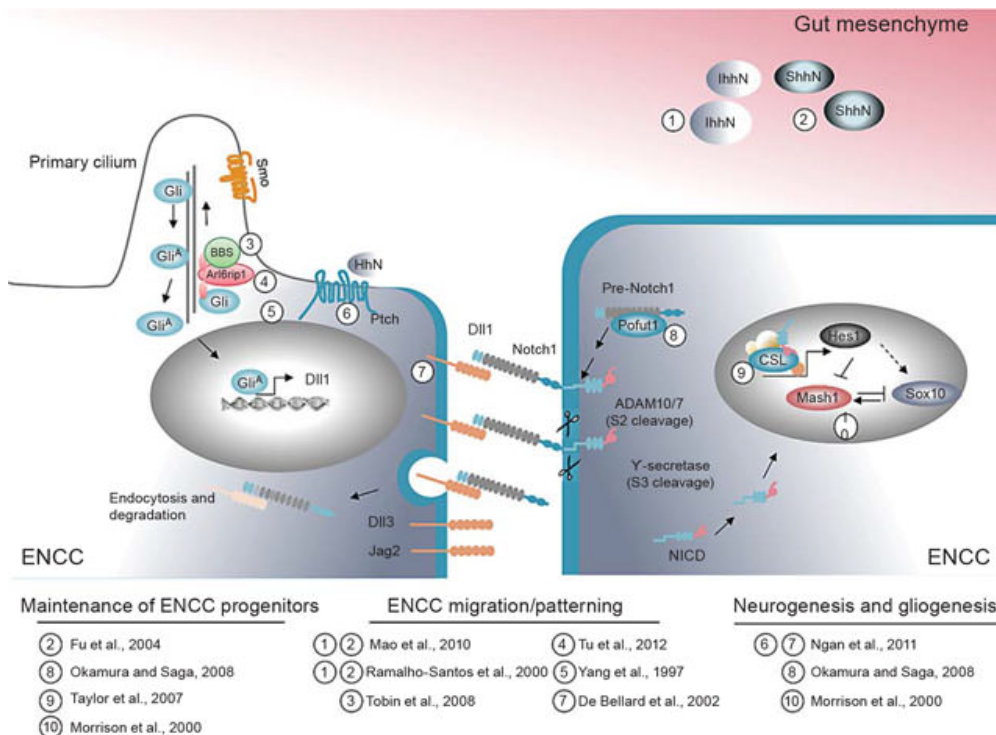


Figura 12. Transducción de señales Hh y Notch en células entéricas.

Tras la unión de la molécula señal (Hh) a su receptor (Ptch), una segunda proteína (de la familia de las proteínas G) denominada Smo se libera de Ptch. Ptch se internaliza y Smo activo se acumula en la membrana del cilio primario, que induce la traslocación de proteínas Gli a la punta del cilio primario mediante transporte intraflagelar. Smo actúa sobre Gli y la activa, de forma que ésta migra al interior del núcleo donde actúa como un factor de transcripción que pone en marcha la síntesis de proteínas que conducen a las células progenitoras a proliferar. En ausencia del ligando Hh, el receptor Ptch permanece en la membrana ciliar y previene la entrada de Smo en el cilio primario, reprimiendo su actividad.

No obstante, en neuronas adultas de roedores, que también presentan cilio primario, se han localizado en la membrana receptores específicos para diferentes tipos de neurotransmisores, particularmente SSt3 receptor de la sustancia P, receptores de serotonina 5-HT y receptores de dopamina (D1).



Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia del receptor SST3 (receptor de somatostatina) en el cilio primario de ratones les sirve para reconocer nuevos objetos ó para recordar los ya familiares. (Brailov et al. 2000).

### **III.- Objetivos del estudio.**

Dadas las funciones descritas del cilio primario, y la concordancia del hecho de que las células progenitoras del SNC (que pueden diferenciarse bien en astrocitos ó bien en neuronas) constan de cilio primario, queremos demostrar, mediante técnicas de Microscopia Electrónica, la existencia de dicho cilio en las células gliales del Sistema Nervioso Entérico en el colon humano.

Si éste cilio primario existe, podremos definir las características ultraestructurales específicas de estas células, así como su nicho natural.

De ésta forma podríamos sentar las bases que permitan seguir investigando la posibilidad de que estas células gliales, en las que hemos encontrado cilio primario, tengan capacidad regeneradora en el SNE adulto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de colon humano proceden de los bordes sanos de resección de piezas quirúrgicas enviadas al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Lozano Blesa para su estudio.

En primer lugar se fija la muestra por inmersión en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato salino (PBS). El tiempo desde la extracción hasta la fijación de la muestra, debe de ser mínimo para evitar alteraciones en la muestra, dada la alta sensibilidad de las neuronas ante la hipoxia. Posteriormente a la fijación, se procede al lavado con PBS. Una vez hecho esto, se introducen las muestras en una solución de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% en PB 0.1 M, con ello conseguimos fijar los fosfolípidos de las membranas.

A continuación, realizamos tres lavados y procedemos a deshidratar la muestra mediante continuos lavados con alcohol a concentraciones crecientes: 30%, 50%, 70% (Nota: los lavados con alcohol deben realizarse de forma rápida para evitar rehidratar la muestra). Una vez alcanzada una deshidratación con alcohol de 70%, lavamos con acetato de uranilo al 2%, con el fin de proporcionar a la muestra mayor densidad al paso de los electrones. Continuaremos con dos lavados sucesivos en alcoholes de concentración creciente, ésta vez 70%, 96%, y 100%.

Una vez se completa el proceso de deshidratación se lavan las muestras con óxido de propileno a temperatura ambiente. El agua extraída de la muestra será sustituida por un polímero plástico (araldita) que aumentará la consistencia del tejido. Se transfieren las muestras a la araldita y se dejan toda la noche en una estufa a 70°. Al polimerizarse la araldita obtenemos un bloque que contiene la pieza de tejido. Se elimina el plástico sobrante (tallado del bloque en el Piramidotomo) y se realizan cortes en el ultramicrotomo, cuyas cuchillas pueden ser de vidrio o de diamante.

Éstos cortes son de dos tipos. En primer lugar, los semifinos, se tiñen con azul de toluidina y se observan al microscopio óptico. Sirven para seleccionar la región óptima y, tras su retallado, realizar cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos se recogen en rejillas y se contrastan con nitrato de plomo durante 5 a 30 minutos. Las muestras están preparadas para verlas en el microscopio electrónico de transmisión.

## RESULTADOS

Para realizar éste estudio, hemos enfocado la búsqueda del cilio primario tomado ganglios del plexo mientérico humano, para posteriormente investigar la presencia de cilio primario en cada uno de los diferentes tipos de glía.

Los ganglios del plexo mientérico se localizan entre las dos capas de musculatura lisa del colon humano. Las células gliales en la periferia de los ganglios presentan un núcleo de forma redondeada con pequeñas indentaciones y se caracterizan por la presencia de eucromatina desespiralizada y una pequeña franja de heterocromatina marginal. (Figura 13).

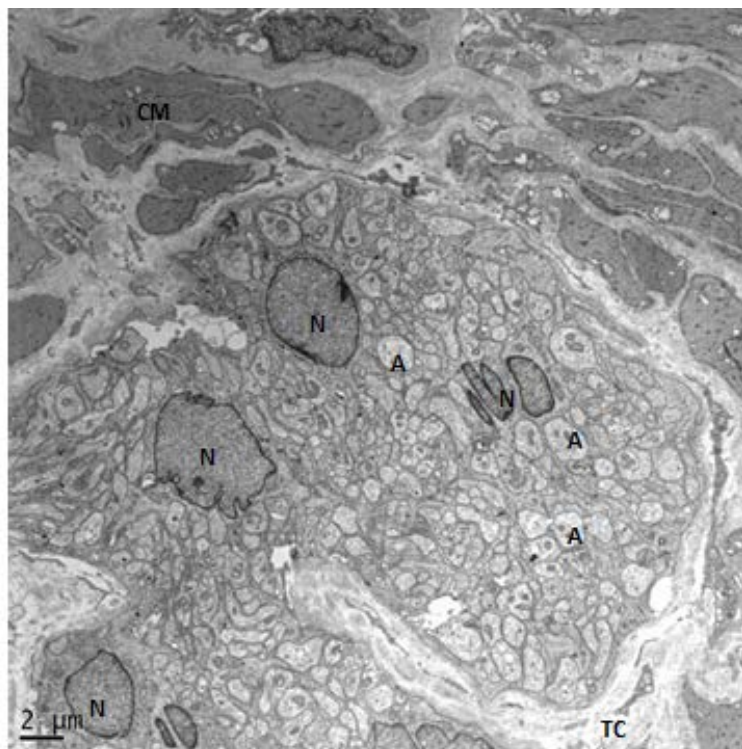


Figura 13- MET. Panorámica de un ganglio del plexo mientérico del colon humano. N: Núcleos de células gliales. A: Axones cortados de través. CM: Células musculares lisas de la musculatura longitudinal. TC: Tejido conectivo.

Estas células extienden prolongaciones citoplasmáticas alrededor de los axones que forman parte del ganglio. (Figura 14).

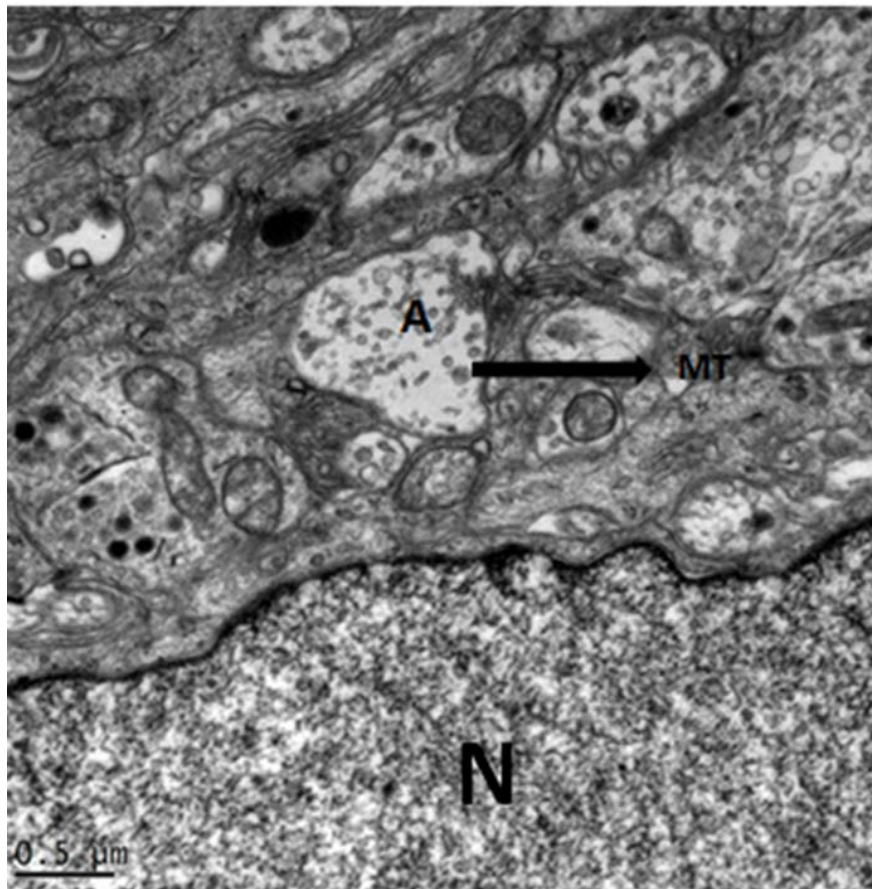


Figura 14- MET. Célula glial y axones ganglionares. MT: Microtúbulos.

En estos axones, la microscopía electrónica nos permite distinguir incluso el tipo de neurotransmisor que circula por ellos. En la imagen podemos ver la sección transversal de dos de estos axones, en la parte anterior con vesículas colinérgicas y alguna mitocondria en su interior, y en la parte superior vemos un axón mixto con vesículas colinérgicas y peptidérgicas.

Entre ambos axones, se observa citoplasma de la célula glial, en la que se pueden apreciar gliofilamentos. (Figura 15).

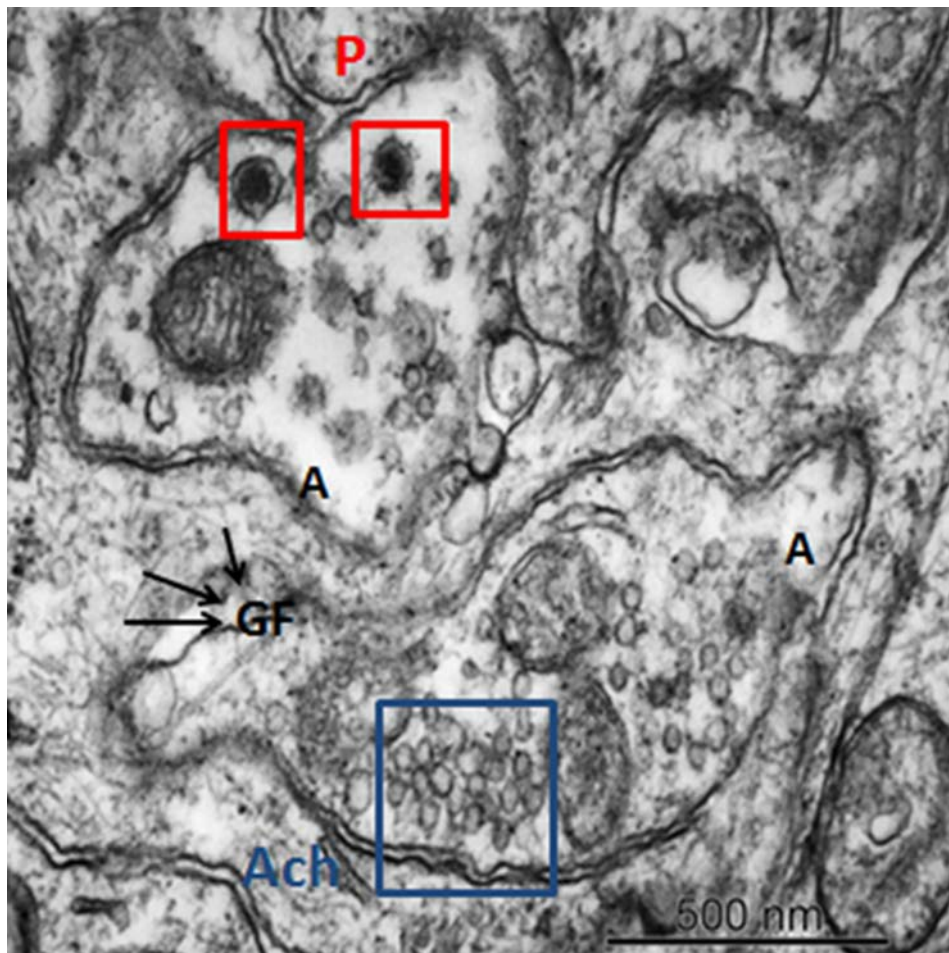


Figura 15- MET. Varicosidades axonales. Ach: Vesículas de acetilcolina. P: Vesículas peptidérgicas. GF: Gliofilamentos.

Las neuronas de los ganglios entéricos se identifican por presentar un núcleo electronclaro muy voluminoso en el que destaca un nucleolo prominente. Son de mayor tamaño que las células gliales que la rodean. (Figura 16).

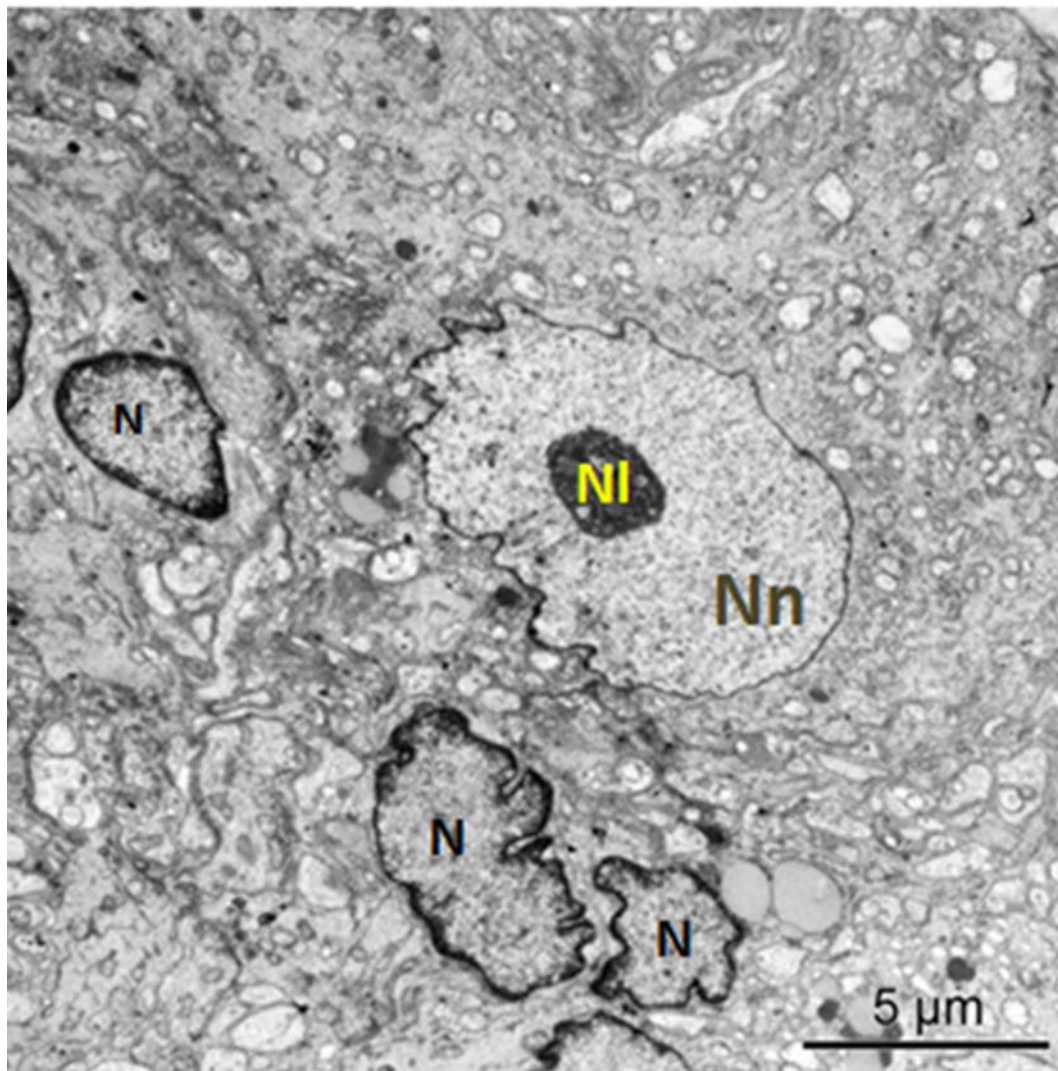


Figura 16- MET. Neurona en un ganglio del plexo mientérico rodeada por células gliales

Nn: Núcleo neuronal. NI: Nucleolo neuronal. N: Núcleo glial.



Rodeando el ganglio encontramos células intersticiales de Cajal, caracterizadas por poseer un núcleo muy voluminoso, con escaso citoplasma perinuclear que se alarga sin embargo en enormes prolongaciones. Estas células pueden establecer contacto, tanto con ganglios como con células musculares lisas. (Figura 17).

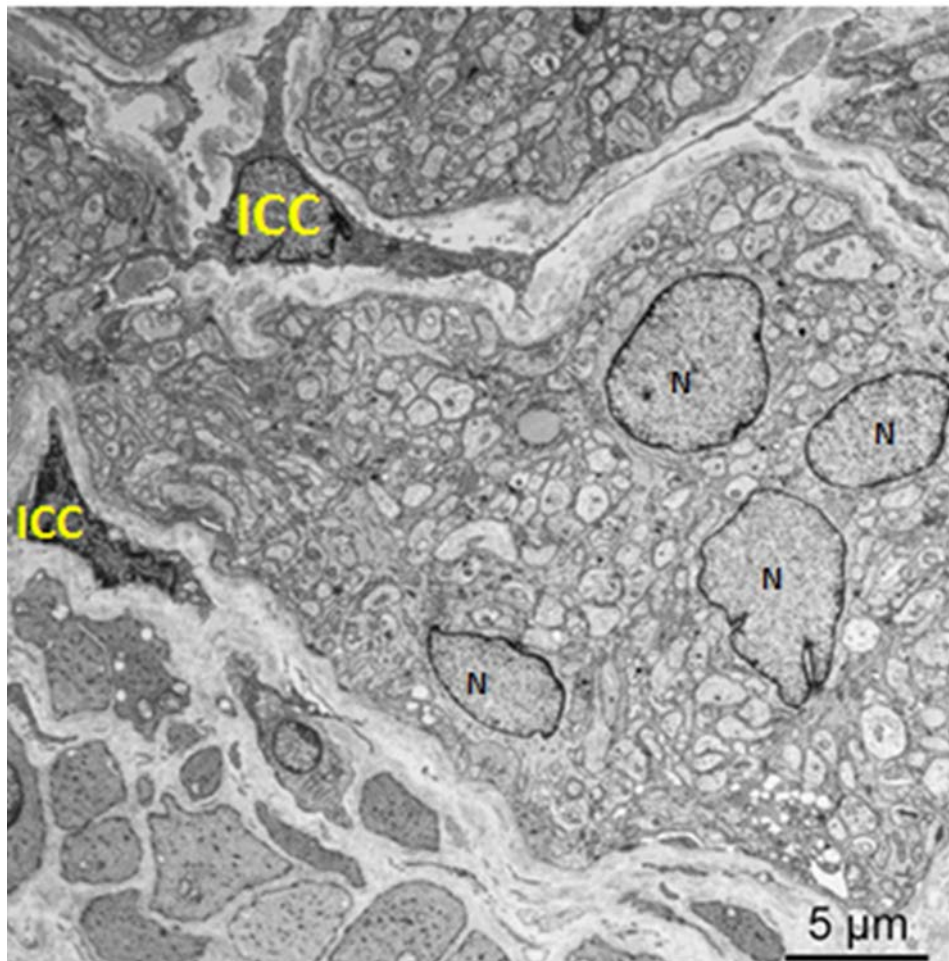


Figura 17- MET. Células intersticiales de Cajal (ICC) rodeando un ganglio entérico.

Estas células contactan entre sí por medio de sus prolongaciones. (Figura 18).

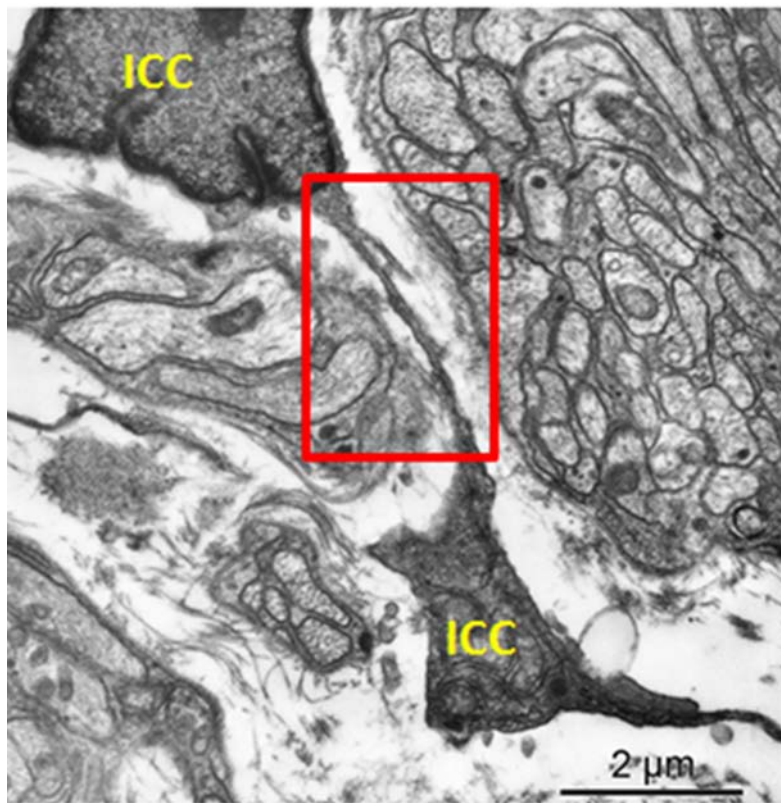


Figura 18-MET. Contactos entre dos células intersticiales de Cajal por medio de sus prolongaciones.

En las células gliales situadas en la periferia del ganglio hemos centrado fundamentalmente la búsqueda del cilio primario. La localización del mismo sólo se puede realizar tras un estudio minucioso ya que el cilio primario no proyecta hacia el exterior de la superficie del ganglio, pudiendo aparecer, como en la imagen, rodeado de axones. (Figura 19 A).

Para poder conocer la ultraestructura del cilio primario es necesario realizar cortes ultrafinos seriados, ya que es muy difícil que en un solo corte aparezca el cilio en su totalidad.

En el primer corte observamos con nitidez el cuerpo basal del cilio, y las fibras transicionales que se unen a la membrana plasmática de la célula glial. (Figura 19 B).

En la siguiente sección podemos observar cómo el axonema proyecta hacia el exterior de la célula glial observándose los pares de microtúbulos que discurren longitudinalmente por el axonema. Éste axonema se encuentra envuelto en una invaginación de la membrana que constituye el bolso ciliar. (Figura 19 C).



En la tercera sección seriada vemos la máxima proyección del axonema pero sin embargo ha desaparecido el cuerpo basal. Vemos como el axonema protruye entre dos axones (uno cortado transversal y otro longitudinal) y únicamente se puede observar a un aumento elevado. (Figura 19 D).

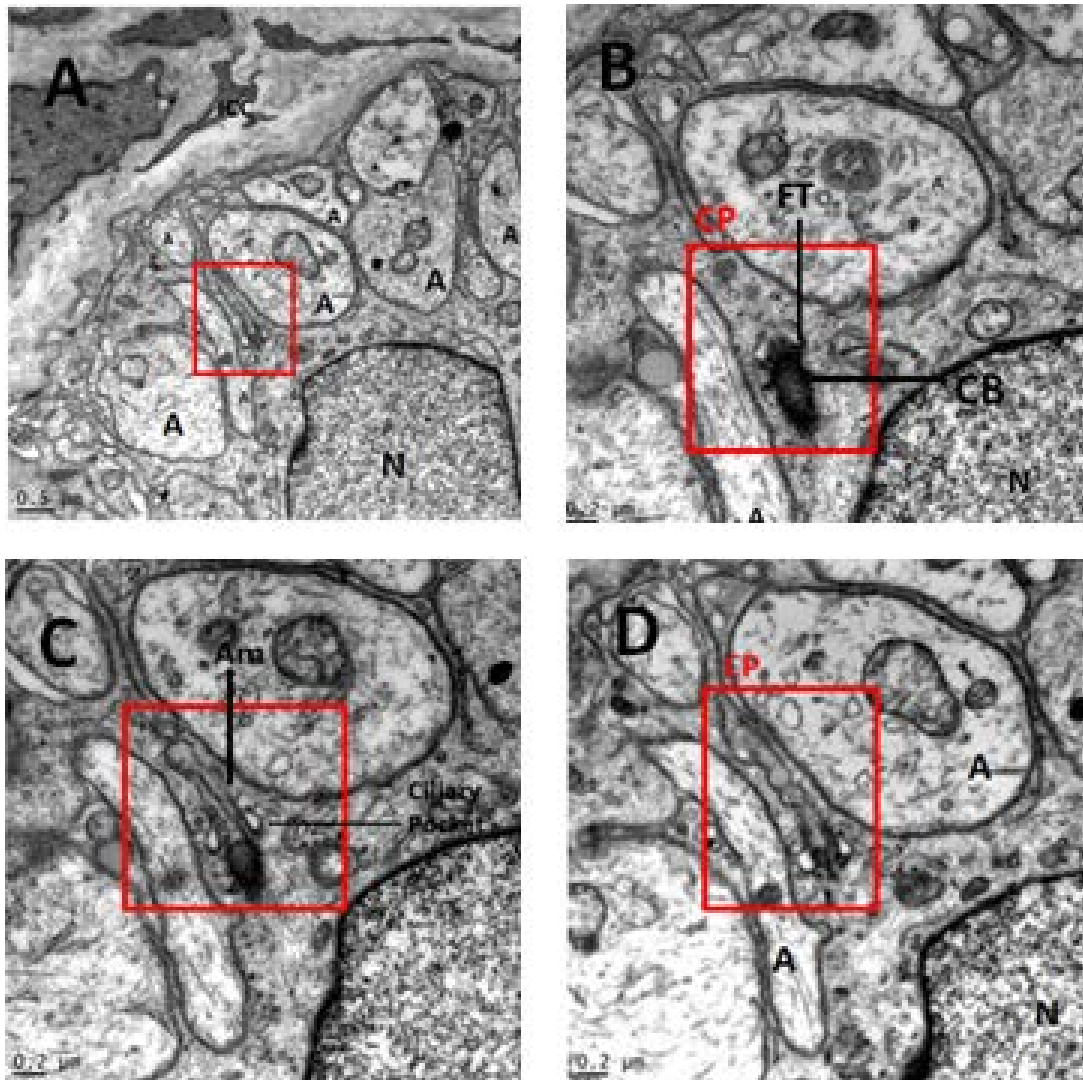


Figura 19 – MET. Célula glial con un cilio primario en su superficie localizado entre dos axones (recuadro).

19 A: Panorámica de la célula glial cuyo cilio primario se encuentra entre dos axones. En B, C, y D se muestran imágenes seriadas de dicho cilio.

19B: se observa con nitidez el cuerpo basal.

19C: Invaginación de la membrana (bolso ciliar) en la que se aloja el axonema del cilio.

19D: se observa el axonema entero pero en este plano ha desaparecido el cuerpo basal.

(CP: Cilio primario. CB: Cuerpo basal. FT: Fibras transicionales. N: Núcleo. C. *Ciliary pocket*. Am: Axonema.)

En los troncos nerviosos que interconectan los ganglios también existen células gliales con características similares a las descritas en la periferia de los ganglios. (Figura 20).

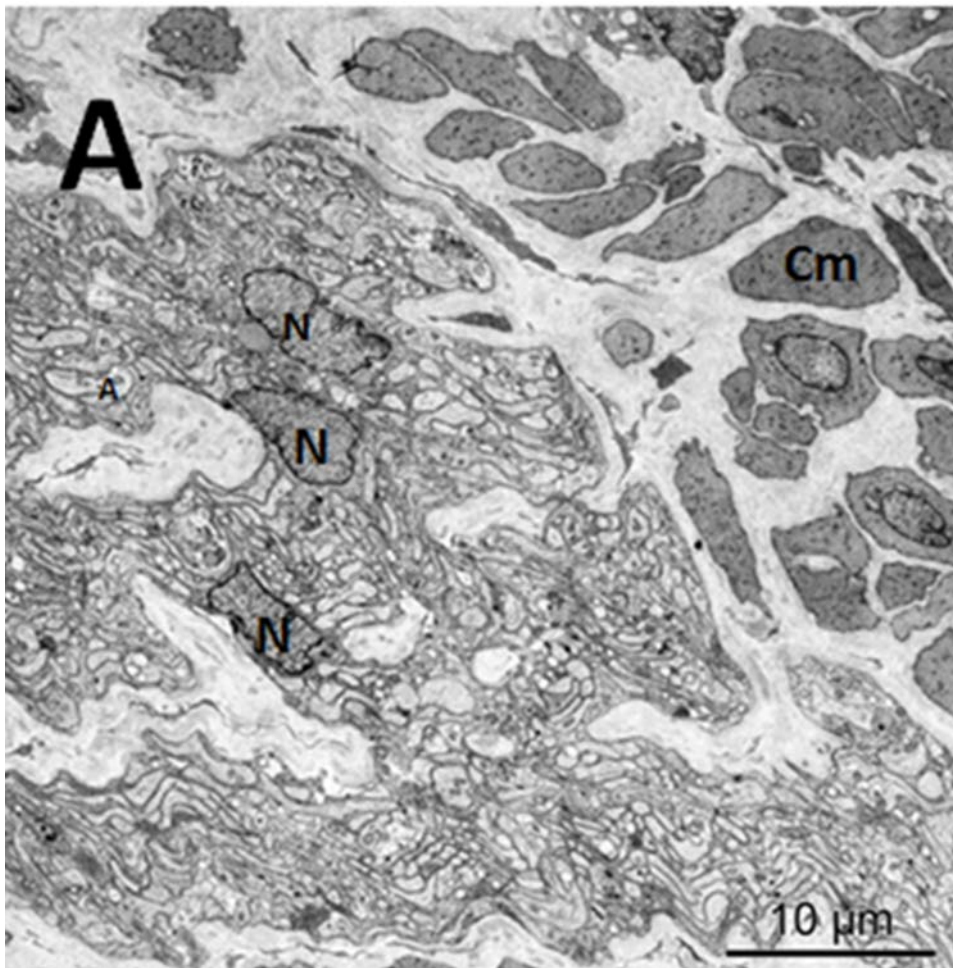


Figura 20 – MET. Panorámica de tronco nervioso de interconexión ganglionar.

El citoplasma de estas células gliales recubre los axones que constituyen estos nervios. Y en algunas de estas células hemos localizado también la presencia del cilio primario. (Figura 21 A).

El siguiente cilio primario presenta una ultraestructura similar a la descrita anteriormente observándose las fibras transicionales y el cuerpo basal. (Figura 21 B).

El cilio se encuentra incluido en el bolso ciliar. Se observan vesículas de diferentes tamaños. (Figura 21 C).

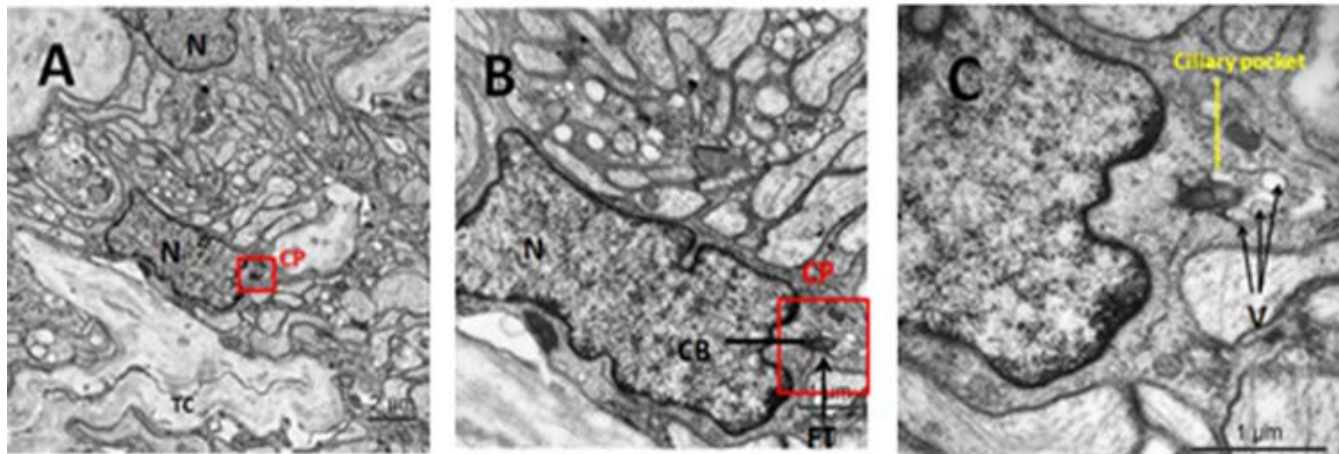


Figura 21-MET. Cortes seriados de cilio primario en una célula glial de un tronco nervioso.

- 21A: Se observa la localización periférica de las células gliales que presentan cilio primario.  
 21B: Se observan las características ultraestructurales de la célula glial rodeando a los axones.  
 21C: Detalle del cuerpo basal del cilio primario .  
 (N: núcleos gliales. CP: Cilio primario. CB: Cuerpo basal. FT: Fibras transicionales.  
 V: Vesículas).

En el interior de los troncos nerviosos se observa un tercer tipo de células gliales con características ultraestructurales diferentes a las anteriormente descritas, ya que el núcleo presenta abundante heterocromatina condensada. Lo que es indicativo de una escasa actividad transcripcional. (Figura 22 A).

El citoplasma de la célula glial se dispone envolviendo a los axones del tronco nervioso y en estas células gliales no hemos localizado ningún cilio primario. (Figura 22 B).

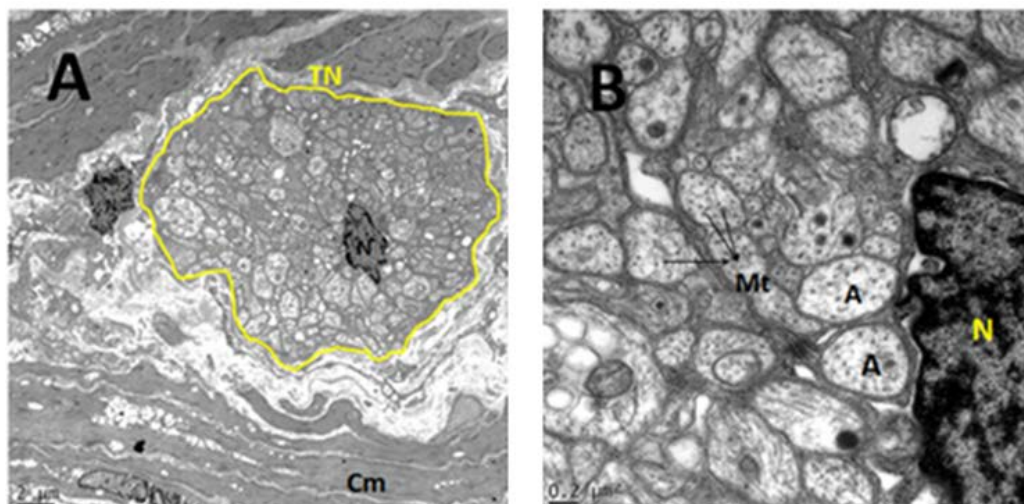


Figura 22 –MET. Tronco nervioso.

- 22 A: Estructura del tronco nervioso intramuscular (TN) que presenta numerosos axones y una célula glial en posición central.  
 22 B: Detalle de A, donde podemos observar el citoplasma glial envolviendo los axones, dentro de los cuales se pueden ver los microtúbulos (Mt). Nótese la mayor cantidad de heterocromatina en el núcleo (N).

## DISCUSIÓN

Este estudio se fundamenta sobre tres hechos documentados:

Primero: Las células de estirpe astrogial, muy similares a los astrocitos del SNC, presentan potencial neurorregenerador en determinadas zonas del cerebro. En estas células se ha documentado la presencia de cilio primario en diferentes mamíferos y en humanos. Estas células progenitoras presentan la capacidad de diferenciarse en astrocitos ó en neuronas.

Segundo: La glía entérica presenta una morfología similar a estos astrocitos.

Tercero: Si la neurogénesis es una función reconocida en determinadas áreas del cerebro adulto, cabe pensar que también tendrá lugar en el SNE.

Hemos centrado la búsqueda del cilio primario en las células gliales del sistema nervioso entérico, de forma que su descubrimiento podría ser una característica ultraestructural indicativa de que las células que lo presentan están involucradas en la regeneración del SNE en adultos.

Se han estudiado los diferentes tipos de glía del plexo mientérico del colon humano, localizándose el cilio primario en células gliales que presentan unas determinadas características ultraestructurales. Sin embargo no ha sido posible encontrarlo en aquella glía que se encuentra dentro de los troncos nerviosos, con lo que surge la pregunta de por qué aparece en unos tipos de glía y no en otros.

Nuestra idea es que las células gliales en el colon humano pertenecen a dos categorías diferentes: las que carecen de cilio primario presentan también características estructurales diferentes como es un núcleo con abundante heterocromatina transcripcionalmente inactiva, que demostraría una menor actividad celular. La presencia del cilio primario en células con abundante eucromatina transcripcionalmente activa, indica un estado metabólico diferente que quizás en futuras investigaciones pudiera correlacionarse con procesos de renovación celular.

En nuestro trabajo hemos demostrado la presencia del cilio primario en algunas células gliales del SNE. Este hallazgo sirve como punto de partida para poder continuar en estudios posteriores su caracterización inmunohistoquímica, lo que nos permitirá valorar la hipótesis de que estas células sean células progenitoras neurales.

El planteamiento de esta búsqueda de precursores neurales en el SNE tiene lógicamente como punto de partida el conocimiento de que en el sistema nervioso central aparecen realmente nuevas neuronas en la vida adulta. Este hecho ha sido demostrado por diferentes autores (Alvarez-Builla et al., 2001). En mamíferos la neurogénesis se produce en determinadas áreas: región subventricular y lóbulo

olfatorio, aunque hoy en día se admite la neurogénesis en el hipocampo (región que permite la adquisición de la memoria nueva). Son células de estirpe astrogial (células B), expresan GFAP y nestina, y tienen las mismas características ultraestructurales que los astrocitos adultos. Pueden aislarse de los centros germinales y cultivarse con factores de crecimiento específicos (EGF y FGF) que permiten su multiplicación formando neuroesferas. Cuando se eliminan estos factores, y son reemplazados por suero bovino fetal, se diferencian hacia neuronas y glía.

Contactan directamente con el ventrículo y emiten un cilio único (9+0), antena que contacta con el fluido cerebroespinal (Han et al.). Esta característica ultraestructural permite identificar in situ a estas células progenitoras.

El tubo digestivo es un órgano complejo sometido a un continuo desgaste. Cuando se produce en él una denervación experimental, se ha observado que a los 7 días aparecen nuevas fibras nerviosas procedentes de las neuronas de las regiones próximas no denervadas. Asociadas a las fibras nerviosas en crecimiento, aparecen células gliales. A los 30 días nuevas neuronas aparecen en la región del plexo mientérico (Hanani et al. 2003). Puesto que la división neuronal es improbable deben existir stem cells que proporcionen las nuevas neuronas. En cultivos de los plexos entéricos se han encontrado células con características similares a las stem cells de la cresta neural. (Kruger et al. 2002). Pero hasta la fecha no se ha encontrado el nicho tisular de estas células ni se han caracterizado ultraestructuralmente.

Ni en las primeras descripciones ultraestructurales de las células gliales de los plexos entéricos de mamíferos (Gabella G. 1981) ni en revisiones actuales (Coelho-Aguiar et al. 2015) se describe la presencia de cilio primario, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados.

¿Puede el cilio primario tener una función similar en la neurogénesis del SNE? Los hallazgos de éste estudio servirán para poder sentar una base científica a la hora de demostrar si dichas células gliales tienen capacidad de regeneración en adultos, lo cual tendría importancia de cara al tratamiento de patología intestinal crónica, cuya homeostasis del tejido glial entérico se encuentra alterada, así como futuras investigaciones acerca de la posibilidad de regenerar tejidos nerviosos, convirtiéndose el intestino en una fuente de la que se pueden obtener precursores neurales con facilidad, a través de una simple biopsia intestinal.

## CONCLUSIONES

En éste estudio, se ha documentado la presencia de cilio primario en ciertos tipos de células gliales del SNE del colon humano.

Estas células gliales se localizan tanto en el interior de los ganglios como en la periferia de los troncos nervoso que interconectan los ganglios.

El cilio primario mantiene una estructura característica 9+0.

Su localización precisa una búsqueda exhaustiva, ya que no sobresale fuera de la superficie ganglionar, apareciendo camuflado entre los axones que rodean las células gliales que lo poseen.

Para conocer bien su ultraestructura es preciso realizar cortes ultrafinos seriados que nos permitan fotografiar sus diferentes componentes, lo que supone una tarea laboriosa.

El significado funcional de este cilio en relación con la Neurogénesis adulta precisará ser confirmado en posteriores estudios.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams G.M. et al. (1981). Central-pair microtubular complex of *Chlamydomonas* flagella: Polypeptide composition as revealed by analysis of mutants. *Journal of Cell Biology*. 91, 69–76.
- Adams M. (2010). The Primary Cilium: An Orphan Organelle Finds a Home. *Nature Education*. 3(9):54.
- Álvarez-Buylla A. et al. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature rev. Neurosci*. 2, 287-293.
- Belkind-Gerson J. et al. (2015). Colitis Induces Enteric Neurogenesis Through a 5-HT4-dependent Mechanism. *Inflamm Bowel Dis*. Apr;21(4):870-878.
- Badano J. L. et al. (2006). The ciliopathies: An emerging class of human genetic disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7, 125–148.
- Badizadegan K. et al. (2014). Presence of intramucosal neuroglial cells in normal and aganglionic human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Nov 15;307(10)1002-1012.
- Brailov I. et al. (2000) Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.*; 872: 271-275.
- Coelho-Aguiar J.M. et al.(2015). The Enteric Glia: Identity and Functions. *Glia*. 63:921–935.
- Einstein E. B. et al. (2010). Somatostatin signaling in neuronal cilia is critical for object recognition memory. *Journal of Neuroscience* 30, 4306–4314.
- Espinosa-Medina I. et al. (2014) Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science*. Jul 4;345(6192):87-90.
- Fliegauf M. et al. (2007). When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 880–893.
- Gabella G. (1981) Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells. *Neuroscience*; 6(3), 425-436.
- Han Y. et al. (2008). Hedgehog signalling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neurosci*. 11: 277- 284.
- Hanani M. et al. (2003). Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J.Comp. Neurol*. 462: 315-327.

Hildebrandt F., Otto E. (2005) Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nature Reviews Genetics*; 6, 928-940.

Irigoin F., Badano J.L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genom.*; 12: 285-297.

Ishikawa H., Marshall W.F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 12, 222-234.

Jin H. et al. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* ;141, 1208–1219.

Junquera C. et al. (2007), Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. *J Cell Mol Med.* 11: 776–787.

Kruger G.M. et al. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential and factor responsiveness. *Neuron*; 35 ,657-669.

Liu J.A., Ngan E.S. (2014) Hedgehog and notch signaling in enteric nervous system development. *Neurosignals.*; 22(1):1-13.

Luesma M.J. et al. (2013). Enteric neurons show a primary cilium. *J Cell Mol Med.* ;17(1):147-153.

Molla-Herman A. et al. (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci*; 123, 1785–1795.

Neunlist M. et al. (2014) Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology*; 147(6):1230-1237.

Pazour G. J. et al. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *Journal of Cell Biology* ;151, 709–718.

Pedersen L.B., Rosenbaum J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signaling. *Curr Top Dev Biol.*; 85: 23-61.

Marshall W. F. (2008). The cell biological basis of ciliary disease. *Journal of Cell Biology.* ;180, 17–21.

Rohatgi R., William J. S. (2010). The ciliary membrane. *Current Opinion in Cell Biology*; 22 (4), 541–546.

Rumessen JJ. (1994) Identification of interstitial cells of Cajal. Significance for studies of human small intestine and colon. *Dan Med Bull.*; 41(3), 275-293.



Satir P. et al. (2010). The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 499–503.

Seeley E. S., Nachury M. V. (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *Journal of Cell Science* 123, 511–518.

Schliwa M., Woehlke G. (2003). Molecular motors. *Nature* ; 422, 759–765.

Silflow C. D., Lefebvre P. A. (2001). Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. *Plant Physiology* ;127, 1500–1507.

Wilson P. D. (2004). Polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*; 350, 151–164.

## **ANEXO:**

Figura1:

[http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Sistema\\_nervioso/Sistema\\_nervioso\\_autonomo.html](http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Sistema_nervioso/Sistema_nervioso_autonomo.html)

Figuras 2 y 3: Coelho-Aguiar et al. 2015

Figura 4: Neunlist. 2014

Figura 5: Archivo del Grupo de investigación B-83. Universidad de Zaragoza.

Figura 6: Molla-Herman et al. 2010

Figura 7: Ishikawa, Marshall. 2011

Figura 8: Rohatgi, William. 2010

Figuras 9 y 10: Adams. 2010

Figura 11: Irigoien, Badano. 2011

Figura 12: Liu, Ngan. 2014

Figuras 13-22: Las imágenes de microscopía electrónica pertenecen al archivo del Grupo de investigación B-83. Durante la realización de este trabajo revisamos dos rejillas de colon humano y obtuve imágenes en el MET.